

特集 最近の医療における感染症対策と研究の進歩**1: 最近話題の感染症 - ゲノム解析から臨床まで -**

インフルエンザウイルスの感染感受性を決定する生体内因子群とその作用機序からみる新たな治療・予防への展開

奥村 裕 司

徳島大学分子酵素学研究センター酵素分子化学部門

(平成16年10月20日受付)

(平成16年10月27日受理)

インフルエンザウイルスが感染性を獲得するためには、宿主側(生体内)のタンパク質分解酵素によるウイルス外膜糖タンパク質(ヘマグルチニン)の限定分解が必須である。この感染力発現に必要な酵素として、異所性アニオニックトリプシン、トリプターゼクララやミニプラスミンを見出してきたが、これらの酵素は気道において異なった局在を示すとともに、ウイルスの亜型によって親和性が大きく異なるため、生体内にはウイルスの亜型に対応した複数の酵素が存在し、個体における感染感受性を決定していることが推察された。一方これらタンパク質分解酵素の抑制物質として、上気道の粘液プロテアーゼインヒビターと下気道の肺サーファクタントを見出し、酵素群と抑制物質の量的バランスが感染感受性を左右することを明らかにした。さらに、その両者のバランスを抑制物質優位に変える薬剤として塩酸アンブロキシソールを見出し、新たな治療・予防への応用を期待している。

はじめに

ウイルス株の変異により、流行を余儀なくされるインフルエンザ感染症は、罹患率が最も高い感染症の一つであり、病状が重篤化しやすい幼児や高齢者、慢性疾患の患者といったハイリスク者にとっては重大な社会問題となっている。更に、トリインフルエンザによる鶏からの新たな感染の危険性や、新型ウイルス出現による大流行の兆しなど、私たちが克服すべき問題点は数多く、現在もインフルエンザの確実な予防と治療法が強く望まれている。

一般に、インフルエンザウイルスに対する感染感受性は個体差が大きく、その違いは、個々の生体内における

感染を促進する因子(リスク因子)と感染を抑制する因子(防御因子)の量的バランスに依存することがわれわれの研究により明らかになってきた¹⁾。生体内ではリスク因子が優位になりやすく、ウイルスは気道に感染して増殖する。このリスク因子としてわれわれは、気道内のトリプシン型プロテアーゼを、また防御因子としては、酵素阻害物質や肺サーファクタントの存在を明らかにしてきた。また更に、両因子のバランスを防御因子優位に制御する薬剤として塩酸アンブロキシソールの作用を明らかにした。本稿では、それぞれの因子の作用機序について紹介し、生体内酵素の阻害と制御因子の増加がもたらす新たな治療・予防への展開について考察する。

1. 生体内感染リスク因子

感染力が強いインフルエンザウイルスではあるが、意外にも感染細胞から出芽したばかりのウイルスはレセプターであるシアル酸への結合能力はあるものの、細胞膜融合活性と感染性は示さず、感染性の獲得には、生体内のタンパク質分解酵素(トリプシン型プロテアーゼ)によるウイルス外膜糖タンパク質(ヘマグルチニン: HA)の限定分解が必須である¹⁻³⁾。そのためヒトのインフルエンザウイルスは、プロテアーゼの局在する気道でしか感染増殖しないと考えられている。われわれはこれまでに、このインフルエンザウイルスの感染性に関与する酵素の検索から、肺胞上皮下層に分布する異所性アニオニックトリプシン⁴⁾、終末気管支や呼吸気管支に分布するトリプターゼクララ⁵⁾、更に細気管支粘膜の分泌細胞に分布するミニプラスミン⁶⁾を見出し、その作用機構を明らかにしてきた(図1)。興味深いことに、これらウイルス活性化(感染力の獲得)酵素は、気道の部位

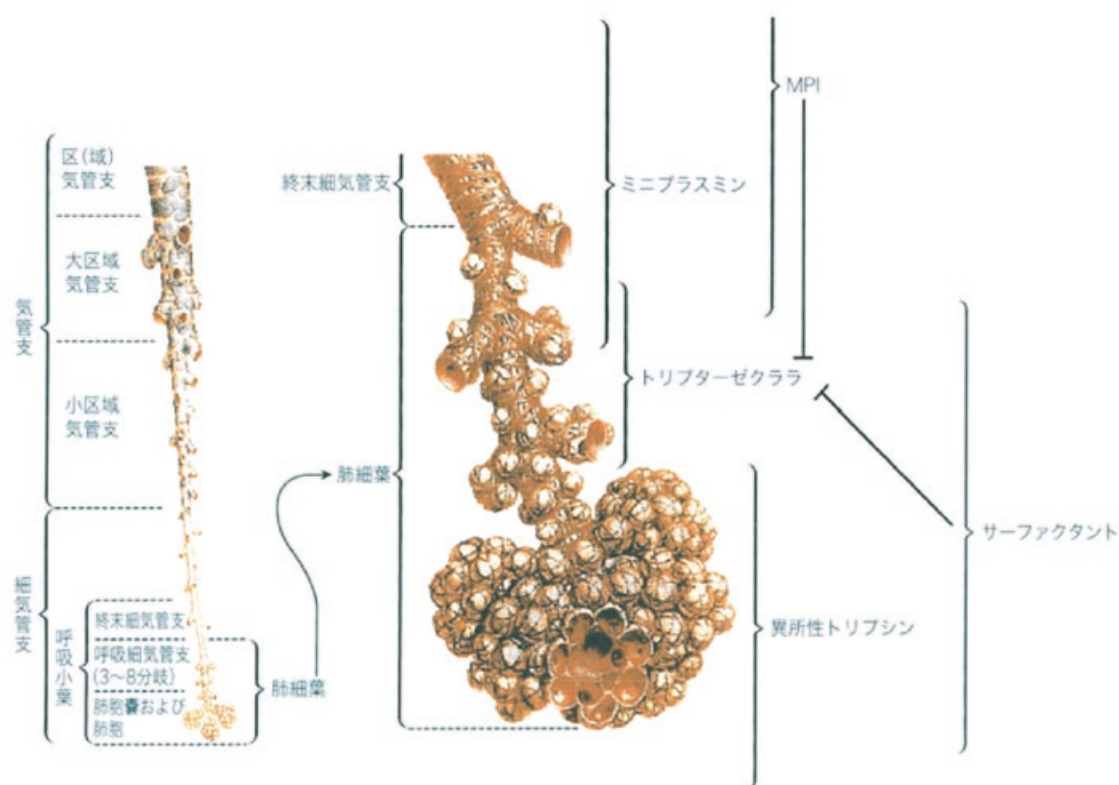


図1 気道内のインフルエンザウイルス外膜糖タンパク質 HA プロセッシングプロテアーゼ群とその阻害物質の分布

肺胞上皮下層には異所性肺アニオントリプシン、終末、呼吸細気管支にはトリプターゼクララが、細気管支にはミニプラスミンが分布する。一方、肺胞、終末、呼吸細気管支には肺サーファクタントが、細気管支から上気道にかけては粘液プロテアーゼインヒビター（MPI）が分布する。

によって異なった局在を示すとともに、ウイルスのサブタイプ（亜型）ごとに異なる親和性（ウイルス活性可能）を示した（図2）。おそらくはウイルス自身の変異と進化による対応であると考えられるが、われわれの生体内にはウイルスの亜型に対応した複数の酵素が存在し、感染臓器特異性や個体における感染感受性を決定づけていることが推察された。また最近われわれは、ヒト上気道に高発現する膜結合型酵素を同定した。この酵素は、線毛上皮細胞の線毛部位に局在し、先に述べた酵素と同様、報告されている全てのインフルエンザウイルス（トリインフルエンザを除く）のHAの切断部位認識構造（-Q/E-X-R-）に相当する人工基質を選択的に加水分解したことから、これまで同定されていなかったウイルスが最初にコンタクトするプロテアーゼとしての可能性が高く、現在もその作用機構を解析中である。

3. 生体内感染防御因子

インフルエンザ感染では、通常感染後4 - 5日で気道

分泌液中にウイルス中和抗体（IgA, IgG）が出現することで、ウイルス量そのものは急速に減少していく⁷⁾。同時に生体は、上記タンパク質分解酵素を阻害し、ウイルスの活性化や増殖を阻止する物質を持ち合わせている。この抑制物質として見出されたのが、上気道に広く分布する粘液プロテアーゼインヒビター（MPI）と下気道の肺と終末気管支に分布する肺サーファクタントである。MPIは主に気道分泌液、唾液、涙液に分泌される生体防御因子であり、図3で示すように、リスク因子であるトリプターゼクララの活性を直接阻害することでウイルスの活性化を制御している⁸⁾。またMPIは顆粒球エラスターゼ活性を阻害することにより、ミニプラスミンの生成を妨げ、ウイルスの活性化を制御していると考えられている。一方肺サーファクタントは、肺胞の型細胞と下気道の粘液分泌細胞から多量に分泌される界面活性化作用物質で、濃度依存的にトリプターゼクララによるウイルスの活性化を制御するが、その作用はトリプターゼクララの吸着によるウイルスの侵入阻止であることが明らかとなっている⁹⁾。

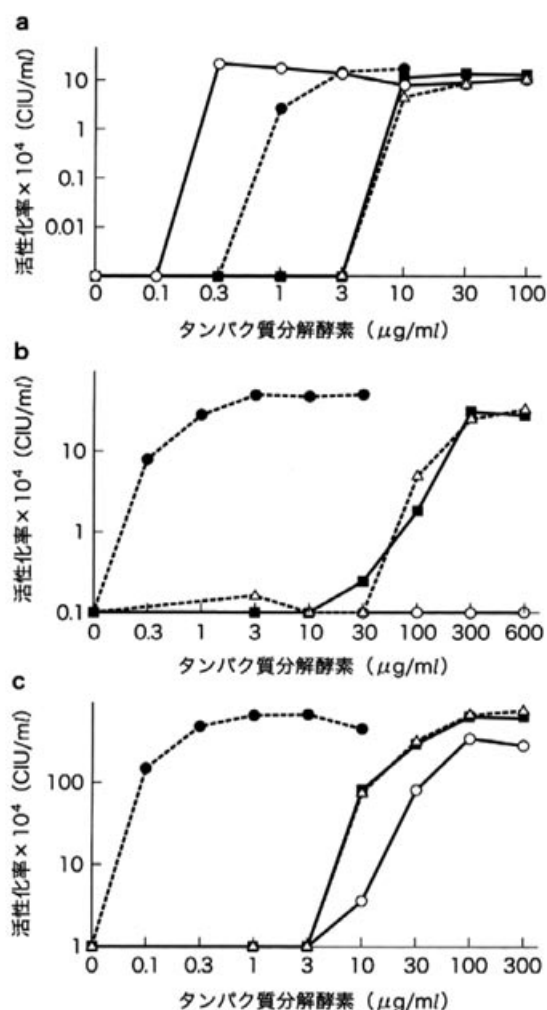


図2 インフルエンザウイルス亜型に対する異所性トリプシン，プラスミン，ミニプラスミン，マイクロプラスミンの感染活性化能の相違

不活性型インフルエンザ A/WSN (H1N1) 株(a), インフルエンザ A/seal/Massachusetts/1/81 (H7N7) 株(b), インフルエンザ A/Aichi/2/68 (H3N2) 株(c), に対し, 種々の濃度の異所性トリプシン(), プラスミン(), ミニプラスミン(), *マイクロプラスミン()を37℃, 30分間反応させた後, 反応後のウイルスを細胞に感染させ, 感染価を測定した。感染価(活性化率)は, 赤血球凝集の認められた細胞を顕微鏡下で測定し, cell infecting units (CIU) として表記した。*マイクロプラスミンは本文中では記載していないが, ミニプラスミンから更にクリンゲル5領域が除かれたペプチドを指す。

4. 感染感受性を左右する両者の量的バランスを変える薬剤

最近われわれは, 従来去痰薬として古くから使用されている塩酸アンブロキシソールに, 用量の増加に伴う気道内のウイルス増殖抑制効果があることを見出した¹⁰⁾。塩酸アンブロキシソールは, 気道分泌中の肺サーファクタント量を, 投与後1 - 2日の早期から下気道で(図4),

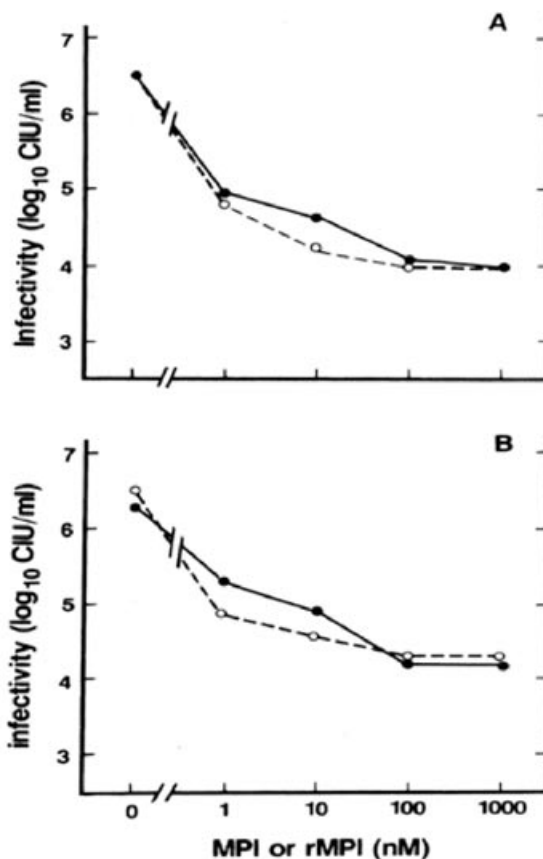


図3 粘液プロテアーゼインヒビター (MPI) によるウイルス感染阻害効果

トリプターゼクララ(1.2 μg/ml)を種々の濃度の精製 MPI() またはリコンビナント MPI()とあらかじめ37℃, 5分間反応させた後, 不活性型センダイウイルス(A), または不活性型インフルエンザ A/Aichi/2/68 (H3N2) 株(B)と37℃, 20分間反応させた。反応後のウイルスを細胞に感染させ, 感染価を測定した。感染価(infectivity)は, 蛍光標識した抗ウイルス蛋白抗体に対する陽性細胞を顕微鏡下で測定し, cell infecting units (CIU) として表記した。

MPI 分泌を投与後4 - 5日目をピークに上気道で著明に増加した。また塩酸アンブロキシソールはこの他に, 感染後期の粘膜型 IgA の分泌量も促進していることが観察された。つまり塩酸アンブロキシソールは, それ自身がウイルスの増殖を阻害するわけではないが, 感染初期の肺サーファクタントの分泌促進に引き続き, 感染後期の IgA, MPI の分泌促進へと, とぎれることなく防御因子優位な状態にすることで抗ウイルス効果を示すことが明らかになった。今後の詳細な分子レベルでの作用機構の解明により, 塩酸アンブロキシソールの抗インフルエンザ作用増強剤や有効なワクチン増強剤としての応用に期待したい。

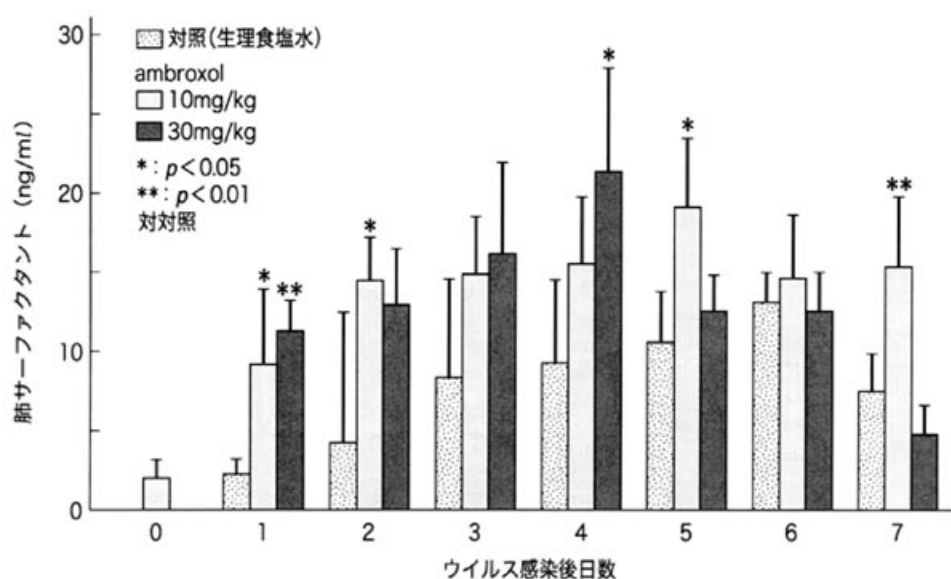


図4 塩酸アンブロキシールによる肺サーファクタント分泌促進作用

3週齢の離乳期マウスに 6.6×10^4 plaque forming unitのインフルエンザウイルスを感染させた後、アンブロキシールを1日2回腹腔内に投与(1日量10および30mg/kg)して、気管支洗浄液(3ml)中の肺サーファクタント量を測定した。

インフルエンザ感染感受性を決定する生体内因子群

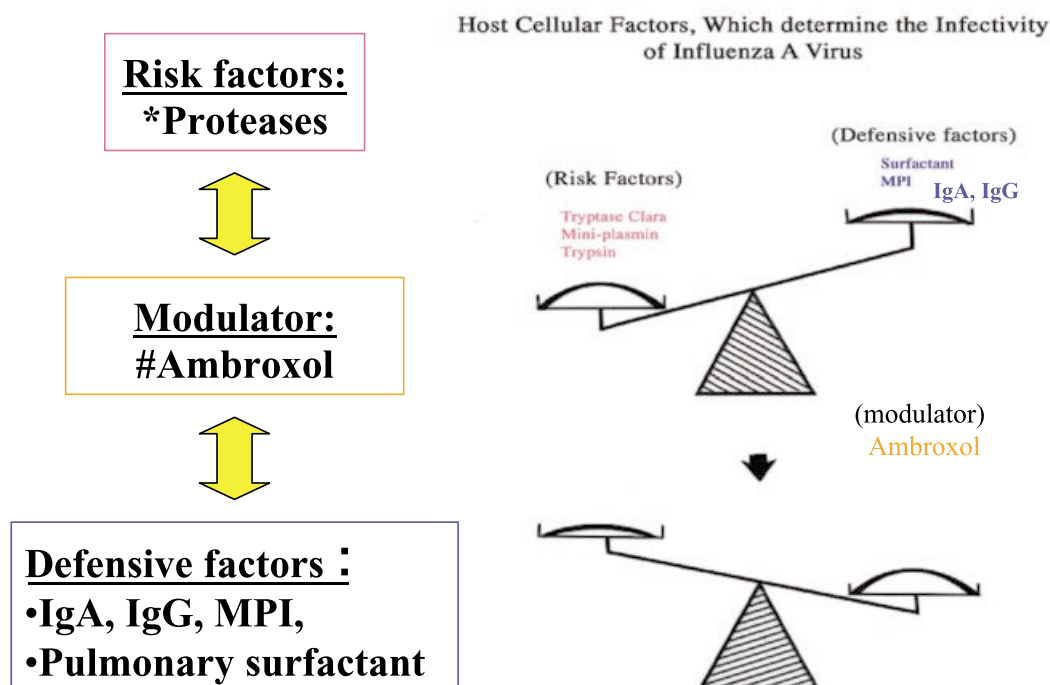


図5 個体のウイルス感染感受性は、感染促進因子(リスク因子)と感染抑制因子(防御因子)のバランスによって決められる。

通常気道内ではリスク因子の量が防御因子群よりも多く、ウイルスが感染しやすい状態にある。しかしながらこれら両因子のバランスを変えることにより、個体の防御機能を高めウイルスの感染・増殖を防ぐ戦略が明らかになってきた。

5. おわりに

現在, 抗インフルエンザ薬として知られているアマンタジンやタミフルは, 軽度の意識混濁や興奮といった神経系への副作用と耐性株の出現という問題点を抱えており, より確実に有効な治療法の確立が望まれている。また, 特定の新型インフルエンザウイルス株に対する有効なワクチンの製造あるいは配布にはかなりの時間を要し, 大流行に効果的に対処できるかという不安が残っている。個体のインフルエンザウイルス感染感受性が, 具体的にリスク因子と防御因子のバランスによって決定する(図5)ことが明らかになってきた今, 防御因子を優位な状態に保ち生体防御機能を高める薬剤によってインフルエンザ感染を予防・治療することが期待される。

文 献

- 1) Kido, H., Murakami, M., Oba, K., Chen, Y., *et al.*: Cellular Proteinases Trigger the Infectivity of the Influenza A and Sendai Viruses. *Mol. Cells*, 9(3): 235-244, 1999
- 2) Klenk, H. D., Rott, R.: The molecular biology of influenza virus pathogenicity. *Adv. Virus Res.*, 34 : 247-281, 1988
- 3) Klenk, H. D., Garten, W.: Host cell proteases controlling virus pathogenicity. *Trends. Microbiol.*, 2 : 39-43, 1994
- 4) Towatari, T., Ide, M., Ohoba, K., Yamada, H. *et al.*: Identification of ectopic anionic trypsin I in rat lungs potentiating pneumotropic virus infectivity and increased enzyme level after virus infection. *Eur. J. Biochem.*, 269 : 2613-2621, 2002
- 5) Kido, H., Yokogoshi, Y., Sakai, K., Tashiro, M., *et al.*: Isolation and characterization of a novel trypsin-like protease found in rat bronchiolar epithelial Clara cells: A possible activator of viral fusion glycoprotein. *J. Biol. Chem.*, 267 : 13573-13579, 1992
- 6) Murakami, M., Towatari, T., Ohuchi, M., Shiota, M., *et al.*: Mini-plasmin found in the epithelial cells of bronchioles triggers infection by broad-spectrum influenza A viruses and Sendai virus. *Eur. J. Biochem.*, 268 : 2847-2855, 2001
- 7) Tamura, S.I., Asanuma H., Ito Y., Hirabayashi, Y., *et al.*: Superior cross-protective effect of nasal vaccination to subcutaneous inoculation with influenza hemagglutinin vaccine. *Eur. J. Immunol.*, 22 : 477-481, 1992
- 8) Beppu, Y., Imamura, Y., Tashiro, M., Towatari, T., *et al.*: Human mucus protease inhibitor in airway fluids is a potential defensive compound against infection with influenza A and Sendai virus. *J. Biochem.*, 121 : 309-316, 1997
- 9) Kido, H., Sakai, K., Kishino, Y., Tashiro, M., *et al.*: Pulmonary surfactant is a potential endogenous inhibitor of proteolytic activation of Sendai virus and influenza A virus. *FEBS Lett.*, 322 : 115-119, 1993
- 10) Yang, B., Yao, D. F., Ohuchi, M., Ide, M., *et al.*: Ambroxol suppresses influenza virus proliferation in the mouse airway by increasing antiviral factor levels. *Eur. Respir. J.*, 19 : 1-7, 2002

Host cellular factors, which determine the susceptibility of influenza virus infection : the application of antiviral compounds to prevention and treatment.

Yuushi Okumura

Division of Enzyme Chemistry, Institute for Enzyme Research, The University of Tokushima, Tokushima, Japan

SUMMARY

Extracellular cleavage of virus envelope fusion glycoprotein, hemagglutinin, by host cellular proteases is a prerequisite for the infectivity of mammalian and nonpathogenic avian influenza viruses. In search of such target processing proteases in the airway, we found ectopic anionic trypsin I, tryptase Clara and mini-plasmin. Interestingly, these processing enzymes were localized in the air way with different distribution. In addition, these enzymes showed the different sensitivities to various strains of influenza A viruses. These findings suggested that host cellular proteases determine the susceptibility of influenza virus infection. On the other hand, the activity of these enzymes is strictly regulated by endogenous inhibitory compounds such as mucas protease inhibitor in the upper respiratory tract and pulmonary surfactant in the lower respiratory tract. Furthermore, we identified that ambroxol, known as a mucolytic agent, stimulate the suppressors of influenza-virus proliferation, such as mucas protease inhibitor, pulmonary surfactant and IgA. These findings suggested that the concentration of suppressors in the airway fluid significantly affect the pathogenicity of influenza virus infection. In this review, we discussed that the effects of antiviral compounds including ambroxol on prevention and treatment of influenza virus infection.

Key words : influenza virus, trypsin-type serine protease, mucas protease inhibitor, pulmonary surfactant, ambroxol